life technologies

NEXT

ライフテクノロジーズ情報誌 NEXT 6月号
2014 /June / No.25

NEXT Interview

分解から眺める生命現象

一つひとつの発見が新たな科学を作り出す

水島 昇 氏（東京大学大学院医学系研究科教授）

P. 04 Bolt™ プレキャストゲル & 泳動槽
iBlot® 2 ドライブロッティングシステム
iBind™ Western System
P. 06 Expi293™ Expression System
P. 07 Click-iT® Plus OPP Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kits
P. 08 Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer
P. 10 Antibody Conjugate Purification kits
CellMask™ Green Plasma Membrane Stain
P. 11 EVOS® FL Autoセルイメージングシステム
P. 12 Premo™ Cellular Redox Sensor
Premo™ Cellular hydrogen peroxide(H2O2)Sensor
ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit
P. 14 Ambion® mMESSAGE mMACHINE® Kit
GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit
P. 16 SimpliAmp™ サーマルサイクラー® 96-well 0.2mL
P. 18 Ion AmpliSeq™ Community パネル

Invitrogen™ | Applied Biosystems® | Gibco® | Molecular Probes® | Novex® | Ambion® | Ion Torrent™

分解から眺める生命現象

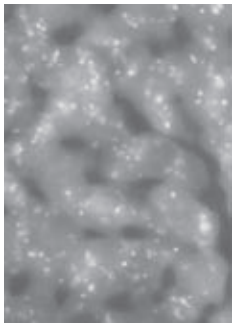
一つひとつの発見が新たな科学を作り出す

水島 昇 氏（東京大学大学院医学系研究科教授）

「生物の体の中では多くの合成系が盛んに働き、
いろいろなものがどんどん増えていくのに、なぜ体はそれほど大きくならないのか。
できたものがなくなる仕組みはどうなっているんだろう」。
そんな学部生時代からの疑問に水島氏が向き合ったのは1997年、
内科医として大学病院で臨床と研究に取り組んでいた頃です。
生化学雑誌で読んだ論文をきっかけに、基礎生物学研究所の大隅良典氏の下で、
細胞内の大規模な分解機構「オートファジー（自食作用）」研究を開始します。
そして酵母において分解するものを包み込み
液胞に運ぶ膜（オートファゴソーム）に関する分子モデルを提唱しつつ、
哺乳類へも研究の幅を広げて多くのオートファジー遺伝子を同定しました。
さらに全身のオートファゴソームが蛍光標識されたトランスジェニックマウスや
オートファジー機能欠損マウスの作製を通して、
その生理的・病態生理的意義を世界に先駆けて報告し続けています。
オートファジーという現象を軸に分野横断的研究を展開し、
このシステムのさらに詳細な仕組みや病気との関連の解析を進める水島氏に
お話を伺いました。

オートファジー研究の広がり

オートファジーは細胞内の分解機構の一つであり、タンパク質やオルガネラをも分解することで、常に細胞の新鮮さを保つ役割を担っています。例えば神経細胞では、オートファジーが細胞内に異常タンパク質の蓄積を防ぎ、神経変性を抑制していると考えられています。水島氏らは、遺伝子改変マウスなどを使い、オートファジーが新生児期に代表される飢餓適応、着床前の初期胚発生、細胞内浄化、神経変性抑止、腫瘍発生抑制に重要であることを明らかにしました。さらに共同研究によって、オートファジーが細胞内侵入細菌の除去や抗原提示などのさまざまな免疫機能に関わることを明らかにしました。2013年に



図左
ミトコンドリアを取り囲もうとしているオートファゴソームの電子顕微鏡像(撮影:岸千絵子)

図右
GFP-LC3マウス(全身のオートファゴソームが緑色蛍光タンパク質で標識されているマウス)の肝臓。24時間絶食後。白い輝点がオートファゴソームを示す。

は共同研究で、神経変性疾患SENDAの原因遺伝子としてWDR45 が同定されます。この遺伝子は、オートファジーの必須分子である酵母Atg18のヒトホモログのひとつWIPI4タンパク質をコードしています。SENDAは、オートファジー遺伝子の変異によって明らかなオートファジー機能低下を示す初めてのヒト疾患であり、オートファジーの異常と神経変性疾患の関連性を強く裏付けるものと考えられます。

オートファジーとの出会い

「研究を始めた頃、オートファジーに関わる遺伝子の機能はまだ分からないことばかりでした。しかし一つの細胞の中で完結することをやってみたいと思い、出芽酵母で実験を開始したんです」と水島氏。1963年にリソソーム研究の過程で発見されたオートファジーは、1980年後半、大隅氏が酵母の液胞の中で観察したことをきっかけに研究が再稼働します。大隅氏の研究室では、変異株を取得してゲノム情報と照らし合わせながら、このシステムに不可欠な遺伝子を次々と同定し、分子生物学的研究の道を拓いていきます。それでも当時、研究者の関心は低く水島氏は次のように語ります。「関連する論文を読む必要もなく、教科書に載っていないので勉強することもなく、すべての真実を自分たちで見つけに行く必要がありました。時には不安になりますが、同時にものすごく楽しむこともできました。なぜなら自分たちが出す一つひとつの結果が、そのまま新しい科学になっていくから」。

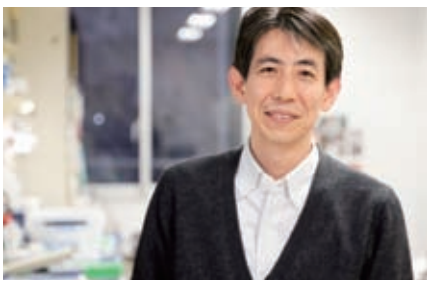
その後水島氏を中心に哺乳類で研究が進むに従い、オートファジーが多くの生物に共通のシステムであるという認識が広がっていきます。そして2006年前後を偏極点にオートファジー研究は華やかな研究の表舞台に立つのです。今では毎週100報近くの論文を数える研究にまで成長しました。「研究を始めた頃は予想もしませんでしたね。多くの論文を読まなければならない今の大学院生が気の毒です」と水島氏は笑いながらコメントします。そんな彼にとって、オートファジーの魅力は「大らかで、大雑把なところ。結構適当なところ」だそうです。もう一つの細胞質分解システムであるユビキチン・プロテアソーム系が不要になったタンパク質に目印をつけて厳密に選択的に分解するのに対し、オートファジーは、約1μmの領域を基本的にランダムに包み込んでリソソームに運びます。「オートファジーにも選択性があることが最近わかってきていますが、それでも『非選択性』にこそ、種を超えて保存されているオートファジーの基本的な秘密があると考えています」と水島氏。

もうしばらく、どこを目指すかを決めずにいたい

「私の研究はプロジェクト型ではなくボトムアップ型であり、どこを目指すかは決めない方が良い気がしています。こんなふうに言うと反対する人もいますが、目標を決めると対象を狭めてしまいそうな気がします」と水島氏。「オートファジーがどんな分野とつながるかは、本当に予測できませんでした。研究を進める過程で、神経や免疫や発生など、思いもかけない分野とのつながりが出てきたのです。もうしばらくは領域を絞らず、逆に分野横断的な横軸の広がりを大事にしていきたいと思っています。ふらふらとやっていきたいですね」。特別な生体反応や限局した時期や場所ではなく、オートファジーは生命現象の根幹となる幅広い役割を担っている様です。

自分にとって解くべき課題をゆっくりと見つけてほしい

これからの科学を担う研究者への水島氏からのコメントを最後に紹介します。「やりたい分野を早く決めない方が良いと思います。なぜなら若いうちは知らないことが多いので、あまり早く決めてしまうと、後から本当にやるべき分野が出てきたときに移りにくいから。私自身も、24、5才と30才の頃では物の見方が違っていました。30才までに科学的な考え方や、問題点や課題の見つけ方を学び、そして自分の残りの35年に何をやるのかを決めるのがベストチョイスでは?」とアドバイスします。水島氏が若い頃の直感でオートファジー研究と出会ったのは、ちょうど30才の頃。限られた外からの情報だけで選ばず、自分の中からやりたいことが湧きでてくるまでじっくり待つことも大事だと語ります。そうすれば誰も手を付つけていない、科学の常識がまだ確立される前の未知の世界へ飛び込むことが、自然にできるのかもしれません。

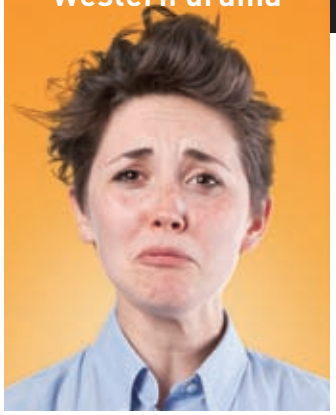


水島 昇(みずしま のぼる)
1991年東京医科歯科大学医学部卒業、1996年同大学大学院博士課程修了、岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所助手、東京都臨床医学総合研究所室長などを経て、2006年東京医科歯科大学教授、2012年より現職。日本学術振興会賞(2008年)やトムソン・ロイター「引用栄誉賞」(2013年)など多くの受賞歴。

ウェスタンブロッティングの膨大な作業量にフラスト

ウェスタンブロッティングにおける3つのステップの時間や手間を減らせ、さらにデータ品質を改善する高性能なツールや技術をご紹介します。

WESTERN WORKFLOW *Easy!*



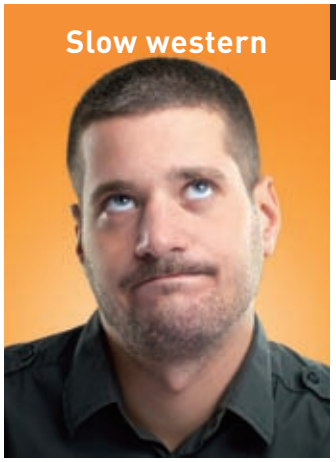
STEP 1

Separate

— タンパク質の分離 —

クリアで高品質な分離バンドが得られる

■ Bolt™ プレキャストゲル & 泳動槽



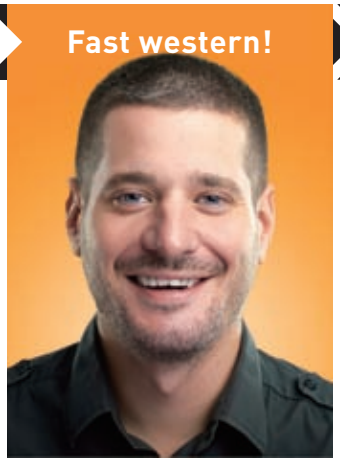
STEP 2

Transfer

— タンパク質の転写 —

わずか7分で転写完了!

■ iBlot® 2 ドライブロッティングシステム



STEP 3

Detect

— タンパク質の検出 —

抗体反応&洗浄ステップを自動化

■ iBind™ Western System

レーションを感じることはありませんか？

Fast! Clear!

中性pH条件下で泳動するので、サンプルやゲルの劣化を防ぎ、高い分離能と安定でクリアなデータを提供します。さらにこのゲルは転写効率が高いので、ウェスタン解析で良好なバンドが検出できます。またBolt™ 泳動槽は、使いやすさを追求し、サンプルアプライや泳動中のモニタリングが簡便です。

- ウェスタン解析に最適な高い分離能と転写効率
- 室温で16か月保存できる長期安定性
- ゲルはくさび型ウェルを採用し、一般的なチップでもアプライしやすい
- 泳動槽はゲル2枚が横並びに配置され、アプライや泳動中のモニタリングが容易

Bolt™ プレキャストゲル & 泳動槽

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Bolt™ Welcome Pack A(4-12% 10well)※	1 キット	B0412A	¥68,000
	Bolt™ Welcome Pack B(4-12% 15well)※	1 キット	B0412B	¥68,000
	Bolt™ Welcome Pack + iBlot® 2 システム	1 キット	B0412AIB2	¥248,000

※Bolt™ プレキャストゲル、Bolt™ 泳動槽、泳動バッファー、サンプル調製用試薬、タンパク質スタンダードのセットです。

転写バッファーを一切使わないユニークな“ドライ式”ブロッティング装置です。わずか7分でタンパク質が転写できます。転写効率や均一性を損なうことなく、ウェスタンブロッティングに要する時間と手間を大幅に削減します。

- タンパク質転写は7分で完了
- 高い検出感度および再現性
- 転写バッファー不要、パワーサプライ不要
- タッチスクリーンによる直感的で快適な操作性

iBlot® 2 ドライブロッティングシステム

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	iBlot® 2 Gel Transfer Device	1 台	IB21001	¥198,000
	iBlot® 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, regular size	10 パック	IB23001	¥22,100
	iBlot® 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, mini size	10 パック	IB23002	¥17,400
	iBlot® 2 Transfer Stacks, PVDF, regular size	10 パック	IB24001	¥24,200
	iBlot® 2 Transfer Stacks, PVDF, mini size	10 パック	IB24002	¥19,000

ウェスタン解析のブロッキングから2次抗体反応後の洗浄までのプロセスを自動化したシステムです。電源を必要としないので、実験室のどこでも使え、全くの無音で反応が進みます。自動化・ハンズフリーによる利便性に加え、さらにマニュアル法よりも良好なウェスタンデータが得られます。

- すべての抗体反応および洗浄ステップを自動化
- 最初に溶液をセットしたら、あとは反応終了まで待つだけ(約2.5時間)
- マニュアル法よりも高感度に検出し、S/N比の高いクリアなウェスタンデータ
- 煩雑な作業から解放され、研究のための新たな時間を確保

iBind™ Western System

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	iBind™ Western Starter Kit※	1 セット	SLF1000S	¥168,000
	iBind™ Western Device	1 台	SLF1000	¥158,000
	iBind™ Cards	10 枚 / 箱	SLF1010	¥17,000
	iBind™ Solution Kit	1 キット(10反応分)	SLF1020	¥8,000

※iBind™ Device、iBind™ Card、iBInd™ Solution kitのセットです。

User's Voice

杉山 暁 氏（東京大学アイソトープ総合センターRI防護・環境保全部門助教）

抗体工学を駆使し、がん幹細胞を狙い撃つ

Expi293™ Expression Systemで抗体タンパク質を高発現へ

人体でより効果的に働く低分子抗体scFvの分子設計を目指して

最先端研究開発支援プログラム（FIRST）の一つ「がんの再発・転移を治療する多機能な分子設計抗体の実用化（中心研究者・児玉龍彦）」として推進されてきた、がんに対する抗体医薬開発。進行したがんは手術しても再発しやすく、また全身に転移すると手術もできなくなりますが、抗体医薬を使えば副作用を抑え、進行がんを治療できると期待されています。東京大学先端科学技術研究センターの杉山暁氏らのグループは、FIRSTで得られた研究成果をもとに、ヒト化抗体や抗原への親和性を高めた低分子抗体scFvの作製を通して抗体医薬への貢献を目指しています。「私たちは、大腸がんの幹細胞に発現している抗原へ特異的に結合するscFvを目印として、抗がん剤をがん幹細胞に適切に届けるために、ストレプトアビジン（SA）とビオチンの強固な結合を利用する方法を検討しています。SAをscFvに付加した状態で体内に投与後、抗がん剤を付加したビオチンを投与することでがん細胞を集中的に攻撃しようというものです」。SAは放線菌由来のタンパク質であるため、体内で抗体が産生されますが、昨年杉山氏らは、低免疫原性化したSAの開発に成功しました。また体内にわずかに存在するビオチンとは反応しないSAの改変も進めています。

Expi293™ Expression Systemで大量かつ効率的な発現が可能に

親和性や安定性が向上する抗体の候補は、共同研究先からのスーパーコンピューターのシミュレーション結果からも上がってきます。いくつもの候補を検証するため抗体発現系の構築は研究の進行に大きく影響します。そこで採用したのが哺乳類細胞での一過性タンパク質の高発現システムExpi293™ Expression System。「他社の安定株発現系も試してみましたが、ライセンス料が高く、安定株を得るまでに時間や手間がかかりました。Expi293™は簡単に使え、数日で多量のタンパク質が得られる点がいいですね。従来製品のFreeStyle™と比べても、細胞の生存率や抗体の発現量が大きく向上しています」。杉山氏がこれまで発現させた抗原や抗体は約30種類。培地30mlあたりで10mgほどの抗体が分泌され、200mlあれば結晶化解析に必要な量が得られるそうです。現在テクニシャンと二人で研究を進めている杉山氏。「発現ベクターの構築には、便利なGeneArt® 人工遺伝子合成サービスも利用していますよ」。作業を最大限効率化させ最適な抗体を絞り込んでいます。

結晶化解析とコンピューターシミュレーションの併せ技で挑む

発現した抗体タンパク質と抗原との親和性を確認するとともに、抗体を精製し結晶解析で抗原との反応を分子レベルで確認することで、さらに新たな変異候補が出てくることもあります。「スーパーコンピューターによるシミュレーションで分子を設計するアプローチと、私のように実際に抗体タンパク質を発現させて結晶構造を解析するという両方のアプローチで、分子レベルでの抗体医薬の設計はより確実になるはずです」と杉山氏。副作用が少なく治療効果の高い抗体の分子設計に向けて、着々と研究が進められています。

Expi293™ Expression Systemを使い、振とう培養でタンパク質を発現中の細胞。培養フラスコに直接8%CO_2を吸入している。

哺乳類細胞でのタンパク質高発現システム

■ Expi293™ Expression System

一過性タンパク質を高い効率で発現するための優れたシステムです。少ない培養量で、より多くのタンパク質を回収できます。無血清培地＋浮遊培養系なので、精製やスケールアップも簡単。FreeStyle™を改良し、従来の2〜10倍量のタンパク質発現を可能にしました。

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Expi293™ Expression System Kit	1 キット	A14635	¥197,000
	ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit	1 培養分	A14524	¥92,000
	Expi293™ Expression Medium	1000 ml	A1435101	¥26,000
	Expi293F™ Cells	1 ml	A14527	¥55,000
	Antibody-Expressing Positive Control Vector	1 バイアル（150µg）	A14662	¥58,000
	Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	100 ml	31985062	¥1,600

培地交換や放射性物質なしで、新生タンパク質をイメージング!

■ Click-iT® Plus OPP Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kits

NEW!

- 培地交換不要: メチオニンや血清を含む完全培地で使え、培地の除去は不要です。
- 非放射性: 従来の35Sメチオニン法のような放射性物質を使いません。
- *in vivo*で機能: *in vivo*のタンパク質翻訳を報告した論文があります。※1. Liu J et al. (2012) Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 413-418
- マルチプレックス可能: 温和なClick-iT® Plus技術を採用し、GFPなど蛍光タンパク質のシグナルを同時検出。
  このキットでは蛍光標識ファロイジンとも組み合わせられます。

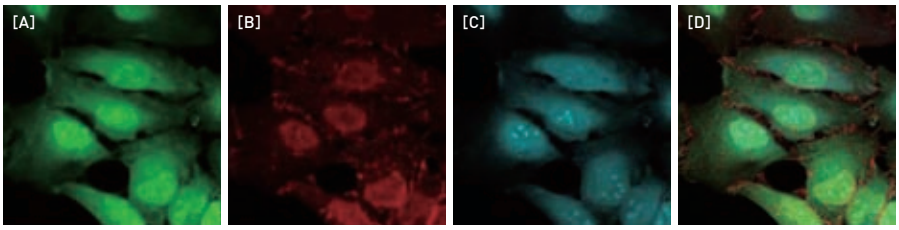
［実験手順］

※2: O-プロパルギル-ピューロマイシン。
ピューロマイシンのアルキンアナログ

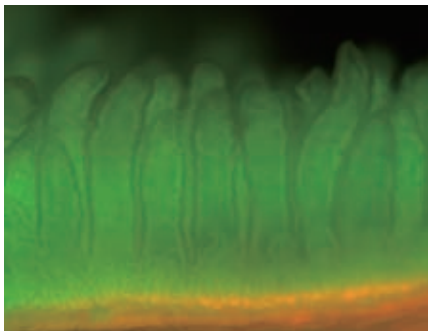
新生タンパク質合成時、OPPが一部のタンパク質のC末端に結合

▶ 既存の取り込み型手法の結果とも一致

HeLa細胞を30分間AHA(製品番号C10102)、もしくはOPP(製品番号C10459)でインキュベート。その後、細胞を固定透過処理しました。
AHAとOPPのClick-iT® 反応は、Alexa Fluor® 488 Alkyne(製品番号A10267)とAlexa Fluor® 647picolyl azide(製品番号C10456)を用いて行いました。コネキシンは、抗コネキシン一次抗体(製品番号712200)とヤギ抗ウサギAlexa Fluor® 555抗体(製品番号A21429)を用いて検出しました。



[A] 緑: Click-iT® AHA Alexa Fluor® 488 Azide protein synthesisを用いたタンパク質合成の検出
[B] 赤: コネキシンの検出
[C] 青: Click-iT® OPP Alexa Fluor® 647 picolyl azideを用いたタンパク質合成の検出
[D] 重ね合わせ画像



▶ *in vivo* 新生タンパク質合成イメージングへの使用例

マウスにOPPを注射し、3時間後に腸の組織を採取しました。
Tetramethylrhodamine(TAMRA)Azide(製品番号T10182)を添加してClick-iT® 反応を行い、タンパク質合成を検出。Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Reagent(製品番号07582)を使用して、腸絨毛(緑蛍光のシグナル)の個々の細胞を染色し強調しました。
これにより、腸絨毛のBasal Section(基部の切片)に、オレンジ蛍光シグナルが検出され、限定的にタンパク質合成が起きていることが示されました。

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Click-iT® Plus OPP Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kit	1 キット	C10456	¥90,000
	Click-iT® Plus OPP Alexa Fluor® 594 Protein Synthesis Assay Kit	1 キット	C10457	¥90,000
	Click-iT® Plus OPP Alexa Fluor® 647 Protein Synthesis Assay Kit	1 キット	C10458	¥90,000
	OPP(O-propargyl-puromycin)	5 mg	C10459	¥180,000

(注)OPPは高濃度ではタンパク質合成に影響するため、最終濃度2〜20μMになるように培地に加えるようにマニュアルに記載しています。文献※1では25μMで阻害が示されています。

ユーザーと共に時間をかけて開発
新登場！最先端フローサイトメーター

■ Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer

NEW!

[今までの機種とはここが違います!]

- 独自開発で使いやすいソフトウェア: ユーザーと共に開発した独自の優れたソフトウェアは直感的に操作でき、未経験者からベテランユーザーまで誰でも扱えます。
- 速やかな検出スピードを実現: データ精度を犠牲にせず、短い解析時間で測定できます。(≧10の5乗cells/mlのサンプルで、10,000eventsを数秒で解析)
- 優れたモジュラーデザイン: 1〜4本のレーザーシステムをたった1日で現場でアップグレード。最大14色の蛍光検出。
- ラボに適したコンパクト設計: 実験ベンチにピッタリ収まるサイズ。限りあるラボのスペースを有効に使えます。
- よりシンプルな流路系: フラットトップレーザーを採用し、より安定した光軸を実現します。

フローサイトメーターにおける細胞増殖測定を新しいステージで

Click-iT® Plus EdUで簡単便利なマルチパラメーター測定

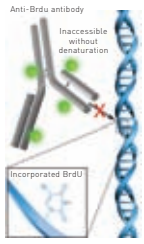
金井 拓哉（ライフテクノロジーズジャパン株式会社　テクニカルサポート）

[要旨]
Jurkat細胞を用い、新しい細胞増殖測定キットClick-iT® Plus EdUと従来のClick-iT® EdUを比較しました。その結果、新しいキットは従来品と同等以上に新生DNAを検出し、優れた多重染色が行えました。また操作ステップに要する時間は、従来品と変わらず、トータル1〜2時間ほどで済みましたが、Attune® Acoustic Focusing Cytometerでデータを比較したところ、新しいキットは従来品よりも解像度が高いことがわかりました。Click-iT® Plusシリーズは従来よりも穏やかな条件下でクリック反応を行うので、これまでは難しかったGFPやPEなどの蛍光タンパク質とも併用できます。

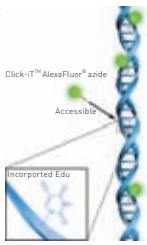
[背景]
これまで細胞増殖測定（S期細胞の同定）には、核酸誘導体としてBrdUを使用するケースが一般的でしたが、DNAに取り込まれたBrdUの検出には抗体を使用するため、事前に厳しい条件下でDNAを変性ステップする必要がありました。これに対して、EdUという核酸誘導体を使うと、検出はマイルドなクリック反応を介して低分子化合物で行うので、変性ステップは不要です（下図参照）。高次構造を保持したままで検出できるので、組織染色にも適しています。

▶BrdU法とクリック反応を用いたEdU法の比較

従来のBrdU法



EdU法



BrdU法は抗体で検出するので、サンプルを塩酸や加熱処理する必要があり、操作が煩雑でデータ解像度も低いという問題点がありました。クリックケミストリに基づくEdU法は、DNA鎖に取り込まれたチミジンアナログのEdUに蛍光色素を特異標識するので、煩雑な処理も必要なく、高解像度のデータを取得できます。

[使用キット]
- Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit (NEW:新製品、製品番号C10632)
- Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit (Classic:従来品、製品番号C10425)

[細胞およびEdUの取り込み]
- Jurkat細胞へEdUをfinal10μMで添加し、37℃5%CO_2環境下で90分インキュベーション

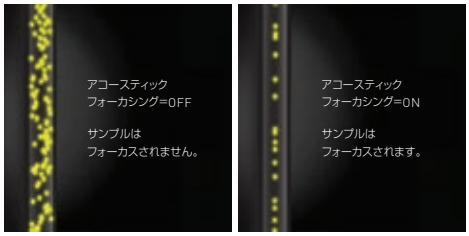
[実験操作]
- 操作は全て製品プロトコルに準じて実施
- 固定処理前にPE標識抗CD3抗体（製品番号MHCD0304）で表面抗原を検出
- 細胞周期解析にはFxCycle™ Violet Stain（製品番号F10347）を使用
- データはすべてAttune® Acoustic Focusing Cytometer（Violet/Blue laser type）で測定

Click-iT Plus EdU (New) & Click-iT EdU (Classic)	Time
細胞へEdUを添加	1〜2hour
細胞を回収	5min
細胞表面抗原の検出（必要に応じて）	15〜30min
Click-iT® Fixativeで細胞を固定処理	15min
Click-iT® permeabilization bufferで細胞膜を透過処理	15min
Click-iT® 検出反応※	30min
細胞内・表面抗原の検出（必要に応じて）	15〜30min
細胞周期解析用蛍光試薬での染色（必要に応じて）	15〜30min
Total	3〜4.5hour

各ステップ間に洗浄操作が必要です。※Click-iT® 検出反応用カクテルの調製ステップも同じです。（混合する試薬の種類は異なりますが、量は変わりません）

▶ 音響技術を利用して、正確・迅速に測定!

音響技術を利用して超音波で細胞をキャピラリーの中心軸に一列に整列させる独自の技術を採用しています(右図参照)。
サンプルスピードに関係なく、レーザー照射の時点で細胞をきちんと集束させることができるので、かつてない高いフローレートで高精度の解析を可能にします。



	製品名	製品番号	価格
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue Laser	A24864	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Red Lasers	A24863	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Violet Lasers	A24862	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Yellow Lasers	A24861	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Red / Violet Lasers	A24860	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Violet / Yellow Lasers	A24859	お問い合わせ
	Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer Blue / Red / Violet / Yellow Lasers	A24858	お問い合わせ

[結果と考察]
Jurkat細胞へ実験方法の通りにEdUを取り込ませて回収後、PE標識抗CD3抗体で表面抗原を標識しました。次にClick-iT® Fixativeで細胞を固定後、Click-iT® permeabilization bufferで細胞膜を透過処理し、それぞれのEdUキットでクリック反応を行いました。さらに細胞周期解析試薬FxCycle™ Violet Stainで細胞内のすべてのDNAを染色し、Attune® Acoustic Focusing Cytometer(Violet / Blue laser type)で測定しました(図1)。細胞周期解析用の蛍光試薬FxCycle™ Violet Stain のシグナルは、細胞のDNA含量に比例するので、細胞周期のどのステージに細胞がいるかを示します(図2参照)。図1の結果より、Click-iT® Plus EdU(緑色)はClick-iT® EdU (紫色) に比べてシグナル分離が優れていることがわかりました。
次に2つのEdUキットのEdU-Alexa Fluor® 488azide由来のシグナルに対する細胞数をカウントしたところ(図3)、Click-iT® Plus EdUでは46%、Click-iT® EdUでは36%となり、新生DNA合成が行われた細胞集団(S期細胞集団)の割合は36~46%という結果が得られました。最後に、PE標識抗CD3抗体で細胞表面のCD3を検出した結果を図4に示します。Click-iT® Plus EdUではClick反応前にPE標識抗体を添加してもデータに影響せず、多重染色が行えることが示されました。これによりClick-iT® PlusはPE標識抗体とも併用できることがわかりました。
なおフローサイトメトリー用Click-iT® Plus EdU キットにはAlexa Fluor 488以外にも、レッドレーザー励起のAlexa Fluor 647やバイオレットレーザー励起のPacific Blueがあり、GFPやPEなどの蛍光色素と柔軟に組合わせて様々なアプリケーションに使えます。

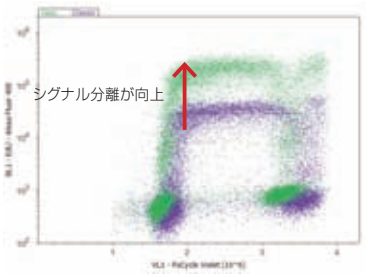


図1 EdUとFxCycle Violetのマルチプレックス解析
X軸は細胞周期ステージ、Y軸は新生DNA合成量を示します。データの組み合わせから、G1/G0期、S期、G2/M期の細胞を同定できます。FxCycle™ Violet Stain のシグナルは、細胞あたりのDNA含量を反映しています(図2参照)。緑はClick-iT® Plus EdU、紫はClick-iT® EdU。

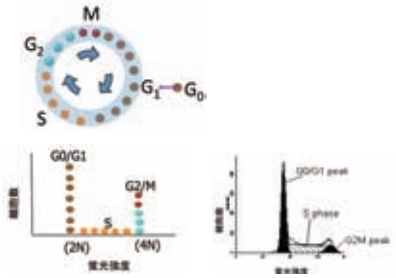


図2 細胞周期と解析試薬の蛍光量の関係
細胞は、分裂前にDNA複製を行い、DNA量が2倍になります(2N→4N)。DNAと選択的に結合する蛍光色素(FxCycle™ Violet Stain)でラベルすると、細胞のDNA量から細胞周期のステージが分かります。

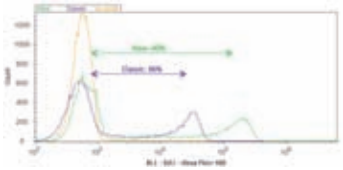


図3 EdU – Alexa Fluor® 488azide由来シグナルの比較
緑はClick-iT® Plus EdU、紫はClick-iT® EdU、黄色はClick反応を行っていないサンプル(No Azide)を示します。

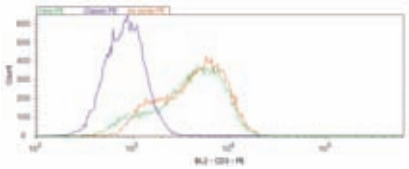


図4 PE標識抗CD3抗体による検出
緑はClick-iT® Plus EdU、紫はClick-iT® EdU、黄色はClick反応を行っていないサンプル(No Azide)を示します。

[まとめ]
- Click-iT® Plus EdUキットは従来のClick-iT® EdUキットと同等以上の性能
- 両キットは操作ステップ、所要時間も同じなので、これまでの実験系を変えずに使用可能
- Click-iT® Plus EdUキットは、PEやPEタンデム、GFPなどと併用でき、マルチプレックス解析により便利

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit(50アッセイ)	1 キット	C10632	¥85,000
	Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit(50アッセイ)	1 キット	C10634	¥85,000
	Click-iT® Plus EdU Pacific Blue™ Flow Cytometry Assay Kit(50アッセイ)	1 キット	C10636	¥85,000
	CD3 Mouse Anti-Human mAb, PE conjugate	0.5 ml	MHCD0304	¥39,000
	FxCycle™ Violet Stain	1 キット	F10347	¥60.000

蛍光ラベル後の抗体やタンパク質の精製を簡便化!

■ Antibody Conjugate Purification kits

NEW!

抗体やタンパク質をラベル後、未反応の蛍光標識物を効率的に除去します。Molecular Probes®の様々な蛍光物質のラベリング後に使用する上で最適なツールです。量に合わせてお選びください。

- 簡便&迅速
  ハンズオンタイム: 5分(20-50µg用)、または15分(50-100µg、0.5-1mg)以下
  トータルの作業時間: 10分(20-50µg用)、または~45分(50-100µg、0.5-1mg)
- Alexa Fluor® などの低分子量色素の除去に最適です。
  ※酵素 (HRP)や蛍光タンパク (R-phycoerythrin)など高分子量タンパク質(>8 kDa)の除去には使用できません。

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Antibody Conjugate Purification Kit for 0.5-1 mg (3回分)	1 キット	A33086	¥27,000
	Antibody Conjugate Purification Kit for 50-100 µg (5回分)	1 キット	A33088	¥27,000
	Antibody Conjugate Purification Kit for 20-50 µg (3回分)	1 キット	A33087	¥27,000
ラベリング効率の確認用 スタンダードも新発売!				
	Alexa Fluor® 488 carboxylic acid (標識レファレンススタンダード用)	5 mg	A33077	¥41,000
	Alexa Fluor® 546 carboxylic acid (標識レファレンススタンダード用)	5 mg	A33079	¥41,000
	Alexa Fluor® 555 carboxylic acid (標識レファレンススタンダード用)	5 mg	A33080	¥41,000
	Alexa Fluor® 647 carboxylic acid (標識レファレンススタンダード用)	5 mg	A33084	¥41,000

※Molecular Probes® では、その他多くの色素についてサクシニジミルエステルやスタンダードを取りそろえています。さらにAlexaやPasific Blueなどの色素には最適化済みのキット品もあります。
一覧はこちらからwww.lifetechnologies.com/LCST

原形質膜を染色し、細胞形態を鮮明に!

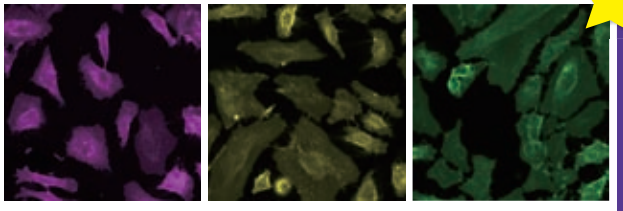
■ CellMask™ Green Plasma Membrane Stain

NEW!

生きたままの細胞形態を観察するための染色試薬です。
顕微鏡観察やハイコンテンツスクリーニングに適しています。

[特長]
- 原形質膜での染色保持時間が長い
- 生細胞で使用可能※
- ハイコンテンツスクリーニングや顕微鏡観察で多くの実績

※固定できますが、浸透処理はできません



Deep Red　Orange　新色Greenが出ました!

細胞膜の染色に脂溶性色素を使うと、急速にインターナライズされ、細胞内に取り込まれます。また標識レクチンは、細胞表面の糖に依存して染色するので、細胞タイプで異なる可能性があり、一貫性が欠ける場合があります。これに対して、CellMask™ シリーズは、原形質膜中のプローブに親和性がある負の電荷を持つ親水性の色素と、膜へのローディングに優れた脂溶性の両方を含む両親媒性分子であるため、より長時間にわたって細胞膜を染色できます。そのため顕微鏡観察や、ハイコンテンツスクリーニングなどでの細胞形態認識が必要な実験で有用です。

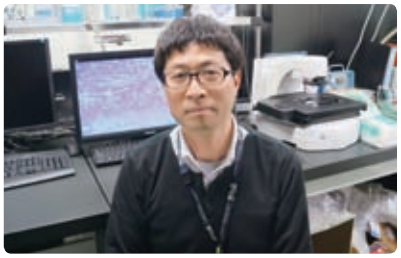
	製品名	サイズ	製品番号	価格
	CellMask™ Green plasma membrane stain	100 µl	C37608	¥24,000
	CellMask™ Orange plasma membrane stain	100 µl	C10045	¥24,000
	CellMask™ Deep Red plasma membrane stain	100 µl	C10046	¥24,000

User's Voice

関根秀一 氏（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 講師）

細胞シートから血管付き三次元組織の作製を目指して

再生医療研究を支えるEVOS® FL Autoセルイメージングシステムの多彩な機能



灌流培養バイオリアクターで血管付き三次元心筋組織を作製

細胞を層状に培養し、患者の様々な組織への移植を目指す細胞シート。これまでシートを多層化していくと酸素や栄養が細胞に行き渡らなくなり、細胞が死滅してしまうという課題を抱えていました。東京女子医科大学の関根秀一氏らのグループは、昨年新たに組織に毛細血管を張り巡らせ、多層化した細胞全体に栄養や酸素を供給することでより厚い心筋組織を作ることに成功。この組織をラット生体へ移植すると、その機能を保ったまま生着することを確認しました。「まず大腿動静脈を含む筋組織を成形することで、血管新生の場となる血管床を作製しました。そして、新たに開発したバイオリアクターで血管新生因子を添加しながら血管床を灌流培養し、血管の成長を促します。さらに血管床の上に血管内皮細胞と心筋細胞を共培養させた細胞シートを積層していくと、3日後に血管内皮細胞から新生した血管と、血管床の血管とがつながることが確認できたんです」と関根氏。これまで臓器の補助的な機能を担っていた細胞シートが、この方法を用いれば12層まで積層でき、より機能的な心筋組織を作製することができました。

EVOS® FL Autoシステムで広い視野や狭い視野も自在に観察

関根氏の研究で欠かせないのは、細胞一つひとつの観察だけでなく、組織が生成していく過程を広い視野で観察する機能。「組織全体を撮影する際、これまでは目測で何枚も撮影し、手作業で画像どうしの境界を照らし合わせながら貼り合せるなど、手間をかけていました。また1倍のレンズで広い視野を撮影することもありましたが、解像度が低下し、見にくいという問題もありました。昨年の9月に購入したEVOS® FL Autoシステムには、広い部分を自動的につないで撮影できるタイリング機能が内蔵されていて、大変助かっています」と語る関根氏。もともとクリーンベンチの中で細胞をカウントするという機能で他のEVOS® システムを検討しましたが、カタログを見ていくうちにタイリングができるEVOS® FL Autoシステムに興味が移っていきました。「タイリングだけでなく、タッチパネル操作で直感的に指で視野を移動させることができ、大変便利ですね。また明視野の撮影に便利なカラーカメラだけでなく、蛍光観察に適したモノクロカメラを搭載しているという点も魅力です」とEVOS® FL Autoシステムの使い勝手をコメントします。さらに今後は、灌流培養による組織の経時変化を解析するため、搭載されている多点タイムラプス機能も使っていきたいとのこと。EVOS® FL Autoシステムの機能をフル活用し、生体内の再現にむけた研究が順調に進められていくようです。

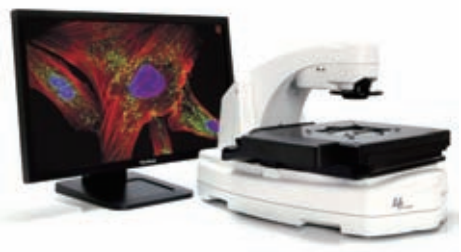
体内環境の再現に目標を定める

今回開発したバイオリアクターによる灌流培養装置は、心筋組織のモデルとしてより再現性の高い薬剤のスクリーニングを可能にします。すでにこの方法でiPS細胞を使った研究も進められているとのこと。腎臓や肝臓、あるいは皮膚組織へも応用を進めたい、と熱意を語る関根氏。「灌流培養の条件を最適化することでより適切な量の酸素や栄養を届けることができ、さらなる多層化も実現可能です。体内環境をいかにして再現するか試行錯誤の毎日ですが、研究を進めていく原動力は実際の人体の環境に近づけた、と感じた時の喜び」と関根氏。様々な臓器そのものの再生技術が少しずつ、着実に現実味を帯びてきているようです。

（写真左）ブタ心臓の切片をEVOS® FL Autoシステムで撮影し、56枚をタイリングした画像
（写真右）バイオリアクターによる灌流培養装置

オールインワン次世代イメージングシステム

■ EVOS® FL Autoセルイメージングシステム



主な機能 ● 画像貼り合わせ ● 多点タイムラプス ● Z- Stack ● オートフォーカス機能
● モノクロとデジタルカメラ両方搭載 ● 96、384 ウェルプレート全ウェルスキャン

▶【組み合わせ例】下記は一部の例です。多数のアクセサリーからカスタマイズ可能

製品名	対物レンズ	Light Cube	メカニカルXYステージ	カメラ	価格
EVOS® FL Auto System	4×Ph, 10×Fl, 20×Fl, 40×Fl	GFP, RFP, DAPI	電動	デュアル　カラー & モノクロ	¥6,800,000

※EVOS® シリーズは全部で5種類です。デモ依頼はこちらまで → www.lifetechnologies.com/evos

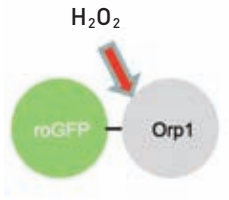
グルタチオン酸化還元電位、過酸化水素の変化を高感度に検出

■ Premo™ Cellular Redox Sensor
■ Premo™ Cellular hydrogen peroxide(H_2O_2)Sensor

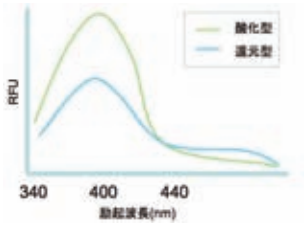
NEW!

生細胞中の細胞内グルタチオン濃度や、過酸化水素濃度の変化を測定する試薬です。細胞内での濃度上昇に応じて、蛍光の励起波長が変化します。検出は、405nmと488nmで励起し、515nmの値を読み取り、その比率を測定します。

- 刺激に迅速に応答し、応答は可逆的
- フィルターが合えば、他の蛍光色素とも同時測定可能
- 培地中の細胞に加え一晩インキュベートするだけで、すぐに使えます。



roGFPはOr1(またはFrx-1)とはタンデム結合でつながっており、BacMam technology を用いて細胞内で発現します。



H_2O_2によってOrp1を介してroGFPが酸化されるとroGFPの励起波長が変化します。

図1.Premo™ Cellular hydrogen peroxide(H_2O_2)Sensorの原理

Orp1は、H_2O_2感受性の酵母タンパク質です。H_2O_2と反応して、ジスルフィドを形成し、ジスルフィド交換によって他の酸化還元タンパク質へシグナルを伝達する能力があります。Orp1のH_2O_2選択特性とroGFPを組み合わせることによって、Premo™ Cellular hydrogen peroxide(H_2O_2)Sensorは、細胞中のH_2O_2を選択的に定量します。Premo™ Cellular Redox Sensor, Grx-1-roGFPはグルタチオンに特異的に反応し、上記と同様の機構でroGFPの蛍光励起波長が変化します。

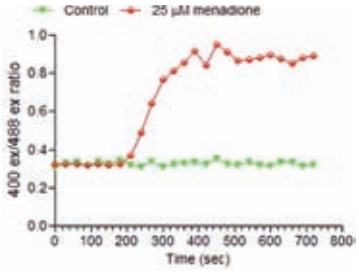


図2. Premo™ Cellular hydrogen peroxide (H_2O_2) SensorによるH_2O_2の検出

Premo Cellular Hydrogen Peroxide(H_2O_2)Sensorを導入したHeLa細胞に、25µMメナジオンを添加後、共焦点顕微鏡で15秒ごとに画像を取得し、蛍光強度比を算出しました。

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	Premo™ Cellular Redox Sensor, Grx-1-roGFP(グルタチオン酸化還元電位センサー)	5 ml	P36242	¥73,000
	Premo™ Cellular hydrogen peroxide(H_2O_2)Sensor, Orp1-roGFP(過酸化水素センサー)	5 ml	P36243	¥73,000

室温保存ですぐ使える便利な細胞生死判別キット

■ ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit

ドロッパーボトルで滴下するだけで、すぐに細胞の生死を判別できます。
しかも室温保存なので実験台の上や培養室などに保管可能。
希釈、秤量、ピペット操作などの作業が不要になります。

[特長]
- ドロッパーボトルで試薬を滴下するだけの簡単操作
- 室温保存OK
- 実験の手間を削減

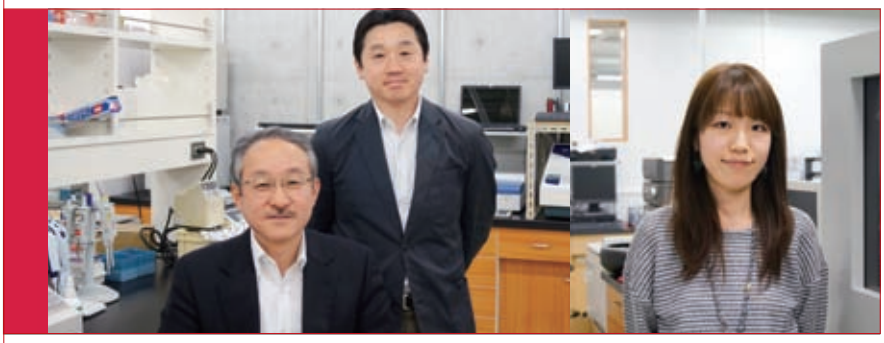
簡単便利なReadyProbes®シリーズは他に核染色やAlexa二次抗体など、全部で23種類。
効率よく実験を進めたい場合に最適です。
詳しくは、www.lifetechnologies.com/readyprobes

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green)	1 キット	R37609	¥28,000
	ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit (Blue/Red)	1 キット	R37610	¥28,000

Leading Edge Topic

エキソソームへの工学的アプローチから 斬新なDDSバイオナノトランスポーター開発へ

秋吉一成 氏(京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 教授)、澤田晋一 氏(助教)、下田麻子 氏(研究員)



生体機能の巧妙な仕組みに啓発され、工学的な手法で新規バイオマテリアルを開発する京都大学の秋吉一成氏(写真左)。体内の狙った場所に薬を届けるDDS(ドラッグ·デリバリー·システム)のキャリアとして、ナノゲル(ナノサイズのゲル微粒子)を開発し、2011年からJST戦略創造研究推進事業(ERATO)「秋吉バイオナノトランスポータープロジェクト」を開始しました。このプロジェクトでは、壊れやすく血中で存在できないRNAを運ぶ生体内キャリアである、「エキソソーム」を工学的に加工して核酸医薬の有望なキャリアとして臨床につなげることが重要な柱となっています。

生体内の核酸キャリアとして働く エキソソームに注目

細胞から分泌されるエキソソームは、miRNAやmRNA、タンパク質を内包して他の細胞へ運ぶ細胞間コミュニケーションを司る小胞であり、近年大きな注目を集めています。秋吉氏は「がんの免疫療法にもエキソソームを活用できるのでは」と考え、三重大学教授の珠玖洋氏と共同研究を推進中です。エキソソームに特別なタンパク質を組み入れるなどして、がんワクチンとしての活用を目指しています。しかしエキソソームの研究を開始した2011年当時、単離方法は確立されておらず、「最初の1年間は、いくつもの方法を試してみました」と秋吉氏。エキソソームの研究を担当している研究員の下田麻子氏(写真右)は、「培養上清など量が多いときは超遠心法、血液など少量の時は試薬キットを使うなど、今は単離方法を使い分けています。キットは最初のスクリーニングなどに便利ですね」とコメントします。まだ不明な点が多いエキソソームの機能解析も、工学的な手法でアプローチしています。「遺伝子組換えでエキソソームの膜タンパク質などを改変して機能を調べても、細胞が作り出すものなので安定せずなかなかうまくいきません。そこで私達は例えば膜そのものを工学的に改変してその機能を調べようとしています」と共同研究者の澤田晋一氏(写真中央)は説明します。

エキソソームにナノゲルや リポソームをハイブリッドする

一方、がんワクチンのキャリアとしてすでに臨床試験の段階にあるのが、前述のナノゲルです。ナノゲルは20〜30ナノメートルの微小なゲルですが、内部に入れたタンパク質の構造を保ったままにできる分子シャペロン機能を持つほか、表面に抗体を付加したり、これらを組み合わせて自在にシートやチューブなどにしたりすることもできます。「エキソソームの機能を人工的に改変して使いたい。ナノゲルとエキソソームをハイブリッドにすれば、さらに使いやすくなりそう」と秋吉氏。例えばエキソソームだけでは細胞内に入らない場合でも、その表面をナノゲルで覆うことで表面がカチオン性になり入りやすくなります。同様にバイオナノトランスポーターとして開発を進めるプロテオリポソームについても、「無細胞タンパク質合成系で膜タンパク質を発現させ、リポソームに直接組み込む方法を確立しています。これを利用して、さまざまな膜タンパク質を組み込んだ人工エキソソーム作製へつなげたい」と語ります。バイオ医薬の実用化を大きく後押しするキャリアの確立に向けて、研究が着々と進んでいます。

ご存知ですか? エキソソーム解析のためのエキスパート試薬

■ Total Exosome Isolationシリーズ

超遠心法と同等のインタクトなエキソソームが短時間で回収できる試薬キットです。細胞培養上清、血清、血漿、尿、その他体液(脳脊髄液、腹水、羊水、母乳、唾液)と幅広いサンプルに対応する回収試薬の他、エキソソームRNAやタンパク質の精製試薬、またエキソソームの蛍光標識試薬も取り揃えています。

製品ラインナップ、詳細はこちらから。→ www.lifetechnologies.com/exosome-jp

ゲノム編集をぐっと身近に

実験ワークフローのキーステップに
高性能で、簡便なツールを使おう!

生物種を選ばず、ゲノム上の任意の遺伝子に変異を生じさせる注目のゲノム編集。現在の主要ツールはTALエフェクターヌクレアーゼ（TALENs）とCRISPR/Cas9システム。実験ワークフローはいずれも標的部位の選択からスタートします。標的部位に対してカスタマイズされたTALENs またはCRISPR/Cas9発現ベクターをプラスミド調製し、細胞へ導入します。または*in vitro*転写で調製したmRNA を導

ゲノム編集ワークフロー 標的部位の選択 → クローニング → プラスミド調製

■ Ambion® mMESSAGE mMACHINE® Kit

ゲノム編集実験で、TALENsやCRISPR/Cas9をmRNAで導入する場合に最適です。

- 最大80%のキャッピング効率
- マイクロインジェクション、in vitro翻訳、トランスフェクションに最適
- キャップ構造を持つRNAを大量に合成可能
- 最適な比率に混合済みのキャップアナログとヌクレオチド
- RNase阻害剤のSUPERase・In™、DNase I、ポジティブコントロールが全て入ったキット

	製品名	サイズ	製品番号	価格
	mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA Kit ※1	10反応	AM1345	¥82,000
	mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit	25反応	AM1344	¥82,000
	mMESSAGE mMACHINE® T3 Kit	25反応	AM1348	¥82,000
	mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit	25反応	AM1340	¥82,000
	Poly(A)Tailing Kit	25反応	AM1350	¥33,500

※1 T7 ULTRA Kit(AM1345)には、Poly(A)Tailing Kit(AM1350)が含まれています。

杉拓磨 氏（京都大学物質–細胞統合システム拠点 さきがけ研究者）

線虫を使い、ゲノム編集で記憶のメカニズム解明に挑む

mRNA注入でターゲット遺伝子の改変を自在に

線虫を使い、記憶のメカニズムを研究中の杉拓磨氏。記憶の保持は遺伝子発現の変化に依存しているという仮説に基づき、記憶に関わるとされる10対ほどの神経細胞での遺伝子発現を解析しています。杉氏は2013年3月頃からTALENsを活用し、記憶に関わる遺伝子の開始コドンを飛ばしたり、プロモーターに変異を導入したりして目的の遺伝子発現を変化させ、その影響を観察しています。「他の生物に比べ、線虫は一世代のライフサイクルが圧倒的に短く、究極のモデル生物と言えます。ゲノム編集を活用することで研究の幅がさらに広がりました。変異体を自在に得られるようになったので、特定の遺伝子の機能を迅速に調べられます」と語ります。

ゲノム編集で線虫の変異体作製が容易に

線虫では、変異原の薬剤を使うなど、これまでもいくつか遺伝子改変の方法がありました。しかしいずれもランダムに遺伝子変異を起こさせてから目的の変異体を探すというアプローチのため、作業が膨大になるという難点があります。一方、ゲノム編集を活用すれば、例えばプラスミド状態のTALENsからmRNAを作り、成虫の生殖腺にインジェクションすることで、F1世代で目的の変異体を素早く得られます。「生まれた個体の5～10%はヘテロの変異を持っています。十分な効率ですね」と杉氏。mRNA合成はAmbion®のmMESSAGE mMACHINE® Kit、続くポリAの付加はPoly(A) Tailing Kit、RNA精製にはMEGAclear™ Kitを使っています。「それぞれのキットのマニュアルが他を意識して書かれていて一緒に使うと便利です」とコメントします。

エピジェネティックな改変にも挑みたい

「遺伝子のノックアウトやTALE-Activator（VP64）による内在性遺伝子の活性化だけでなく、TALエフェクターを活用してエピジェネティックな修飾も試したいですね。細胞系譜が解明された線虫でゲノム編集を使えば、たった一つの神経細胞の、たった一つの遺伝子座の発現制御ができるはず」と今後の展開を語ります。線虫では、あらかじめ振動という恐怖の記憶を与えるトレーニングを施し、その記憶の保持状態を調べています。「記憶のメカニズムが分子レベルで明らかになれば、ゲノム編集を活用して記憶のトレーニングをしていない個体でも、あたかも記憶を保持しているかのような状態を創り出せるかもしれない」と続けます。「線虫というわずか体長1ミリの生き物が示す記憶の実体をとらえ、その結果を記憶異常が関わる疾患解明に役立てることで社会に還元したい」。杉氏は小さな線虫研究から大きな目的へ向かって確実に進んでいます。

入する方法もあります※1。この方法では、ゲノム編集ツールが翻訳後に短時間で効果を発揮することや、発現ベクターにおける最適プロモータ選択の手間が省けるので、一部の細胞や受精卵で利用されます。そしてゲノム編集の後半ステップでは変異導入を評価します。シーケンス確認や定量PCRやウェスタンによる発現解析など目的に応じた方法がありますが、最初に多くのサンプルを調べるにはミスマッチ認識切断酵素と電気泳動による確認法が簡便です。今回は、ゲノム編集のワークフローのキーステップとなる「遺伝子導入（mRNAによる導入）」と「変異導入の評価」に簡便で高性能な2つの製品をご紹介します。

※1　CRISPR/Cas9システムの場合にはCas9 mRNAをguide RNAと共導入します。

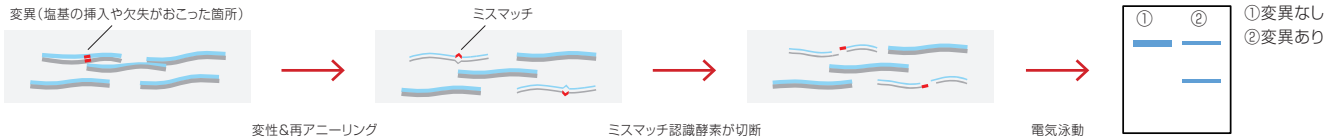
▶ ゲノム編集の原理やツールの情報はこちらから。
www.lifetechnologies.com/GenomeEditors

(Option)mRNA調製 → 遺伝子導入 → 変異導入の評価

■ GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit

TALENsや、CRISPR/Cas9によるDNA二本鎖切断に続いて起こる塩基の欠失/挿入の成功を評価する簡便で信頼性の高いツールです。

- ゲノムDNA,PCR産物の精製不要
- コントロール付きでデータの高い信頼性を確認

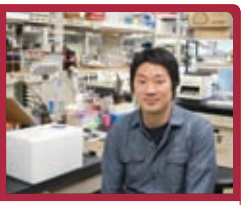


	製品名	サイズ	製品番号	価格
	GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit Cell lysis buffer,AmpliTaq Gold® 360 Master Mix,Cotrol Template & Primers,Protein Degrader,10×Detection Reaction Buffer,Detection Enzyme,Water	20反応	A24372	¥42,000

佐久間哲史 氏（広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 分子遺伝学教室特任助教）

新たな研究ツールとして期待されるゲノム編集の技術開発

効率評価はGeneArt® Genomic Cleavage Detection Kitで定量化



ゲノム編集で有名な広島大学の山本卓教授の研究室で、TALENsやCRISPRを使ったシステムの改良を手がける佐久間哲史氏。歯学部から理学部に転入し、分子遺伝学教室を選んだのは、「（当時ゲノム編集のために同教室で行っていた）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）が広がりのある技術と思い、興味を持ったから」と話します。その後いくつかの新たなゲノム編集技術が登場する中で、佐久間氏はTALENsの作製システムの改良やその活性を高めたPlatinum TALENの開発、さらにCRISPRの改良システムの開発も手がけます。今では上司の山本卓教授も「彼はうちの研究室には欠かせない研究者です」と太鼓判を押すほどに。

ゲノム編集の効率評価はキットで簡単に確認

その佐久間氏が「これは使いやすい」と評価しているのが、ゲノム編集後の標的遺伝子の変異を簡単に検出できるGeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit。ゲノム編集の過程で起きた、塩基の挿入や欠失の成功を定量的に評価できます。「最初に使った他社製品では、プロトコル通りにやってもスメアになったりバンドがたくさん出てきたりして使いづらい点がありました。酵素の量や反応時間を最適化したプロトコルを自分たちで作れば一応使えるようになりますが、初めて使うときにはそれが課題ですね。一方、GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kitは取扱説明書のプロトコル通りにやれば、本当にうまくいきます。初めてやる人でも誰でも使いやすいですし、汎用性が高くていいですね」とコメントします。

さらにエキサイティングな展開へ

ZFNに興味を持って研究者としての道を歩き出した佐久間氏ですが、その作製はなかなかうまくいかず大変苦労したと言います。しかしTALENsやCRISPRが登場し、使いやすいキットやツールが出てきたこともあり、研究がスムーズに進むようになったそうです。そして今後の展開を次のように予測します。「たとえばTALエフェクターとヌクレアーゼを融合させて遺伝子をノックアウトやノックインするだけでなく、転写活性のコントロールやゲノムの特定領域における修飾など、ゲノム編集には多様な可能性があります。将来は遺伝子の機能解析においてRNAiを超えるアプローチになり、PCRの様に誰もが使える技術として研究室に普及するのではないでしょうか」。佐久間氏自身も普及のための講習会やゲノム編集コンソーシアムの活動もこなします。「なるべく多くの人に広く使ってもらえるように、今後もTALENsやCRISPRを使うシステムの改良開発に主眼を置いて進めていきたいですね」と話します。

NEW!

2720サーマルサイクラー®を10年ぶりにモデルチェンジ!

■ SimpliAmp™ サーマルサイクラー®, 96-well 0.2mL

▶ 大画面タッチパネルでコンパクトでもかんたん操作

8インチのタッチパネルスクリーンときれいなグラフィックで必要な機能にすばやくアクセス。

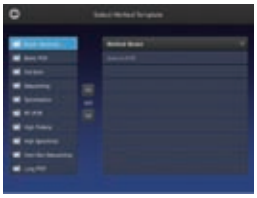
▶ 温度校正済ブロックと高機能なプログラムでPCR条件を精度高く再現

優れたブロック温度移行速度(ランプレート(℃/秒))とその指値コントロールで、微妙な温度変化をきっちり再現。

▶ 機種変更しても再現性を失わないシミュレーションモード搭載

Applied Biosystems® のサーマルサイクラー® はもちろん、他メーカーからの更新でも、温度制御を再現するシミュレーションモードを搭載。ラボの大切な資産を守り、研究を滞らせません。

▶ 利用するアプリケーションをサポートする豊富なプログラム



AmpliTaq® 、Platinum® Taqなどの各種PCRマスターミックスに加え、逆転写のためのSuperScript® 、シーケンスのためのBigDye® など、多くのアプリケーションをサポート

▶ 最新スマートフォンアプリ「PCR essentials」で安心

スマートフォンにダウンロードしてWiFiリンクすれば、ラボと離れたデスクでもサーマルサイクラー® の稼働状況をリアルタイムに確認。
詳しい内容は → www.lifetechnologies/simpliamp

Messages from our Technical Support Staff

▶ おすすめポイント

ランプレートやシミュレーションモードなど、従来の2720サーマルサイクラー®では実現できなかった便利な機能を搭載しました。コンパクトでも、高機能なPCRシステムです。

▶ 15年のテクニカルサポート経験から、もう一言

世界標準として世界中の研究室で愛用されたAppliedBiosystems®のGene Amp® 9600PCRシステム。SimpliAmpのシミュレーションモードを使えば、9600システムを始め、他のサーマルサイクラー®の条件でそのままPCR実験が行えます。買い替えや論文記載の条件を安心して試してください。

▶ こういう研究室にぴったり

PCR実験を行うすべての研究室にお勧めします。大学などでは実験が初めての学生さんも不安なくお使いいただけます。

▶ 最後に一言

困ったときは、いつでも私たちテクニカルサポートにご相談ください!

中山 收

	製品名	サイズ	製品番号	価格
AB	SimpliAmp™ サーマルサイクラー®(一年保証)	一式	SimpliAmp	¥628,000

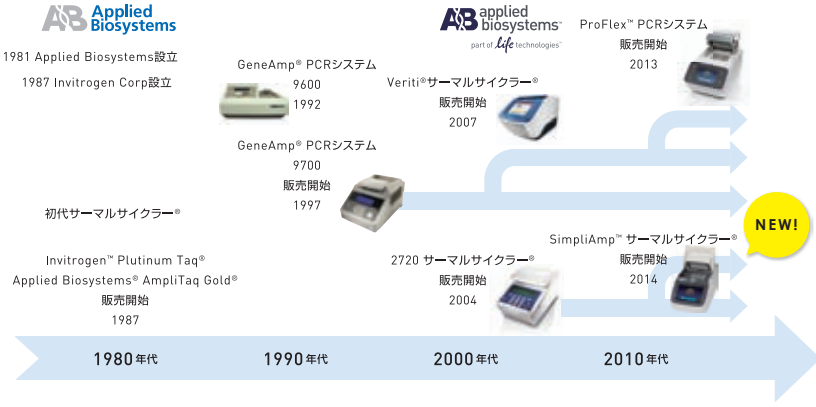
※2年保証の場合は¥668,000です。

大型タッチパネル & コンパクトデザインのサーマルサイクラー® です。

- 8インチ大型タッチパネル
- 優れた温度制御プログラム
- シミュレーションモード
- 豊富なランメソッド
- リモートモニタ

Since 1981
歴史と信頼のApplied Biosystems® ブランド

1987年に世界ではじめてサーマルサイクラー®とPCR酵素を発売以来27年間、
常に先端をいくPCR装置で多くの研究を支えてきました。
SimpliAmp® サーマルサイクラー®は、2720サーマルサイクラー®を10年振りにリニューアル。
歴史と信頼に裏付けられた高性能な機能を搭載しています。



▶ Applied Biosystems® サーマルサイクラー® ラインナップ

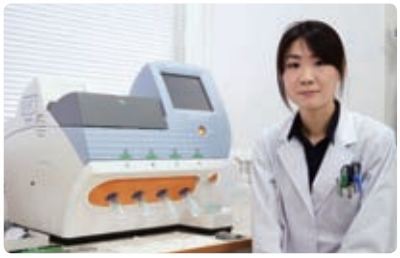
モデル	2720 サーマルサイクラー®	NEW! SimpliAmp™ サーマルサイクラー®	GenAmp® 9700 PCR システム	Veriti® サーマルサイクラー®	ProFlex™ PCR システム
特徴	最もシンプルな機能を コンパクトにパーソナルモデル	最新機能をシンプルに まとめたスマートモデル	多くの研究室で愛用されている ロングセラーモデル	PCR条件の最適化を スマートにこなす スタンダードモデル	メンバーの多い研究室を支える 多機能ハイエンドモデル
ブロック	固定	固定	可変	固定	可変
ウェル	96ウェル(0.2ml)	96ウェル(0.2ml)	60ウェル(0.5ml) 96/2×96ウェル(0.2ml) 2×384ウェル 2×Flat	60ウェル(0.5ml) 96ウェル(0.1/0.2ml) 384ウェル	3×32ウェル(0.2ml) 96/2×96ウェル(0.2ml) 2×384ウェル 2×Flat
シミュレーション		9600, 9700, 2720	9600, 9700	9600, 9700	9600, 9700
VeriFlex™		3 Zones VeriFlex™		6 Zones VeriFlex™	6 Zones VeriFlex™
ランプレート	ND	4.0℃/秒	5.0℃/秒	5.0℃/秒	6.0℃/秒
価格	¥460,000 新価格	¥628,000	¥850,000～	¥980,000～	¥1,250,000～

User's Voice

坂井和子 氏（近畿大学医学部ゲノム生物学教室助教）

網羅的ながん体外診断のバイオマーカー探索研究

Ion PGM™システムとAmpliSeq™技術で研究を効率化



がんの体外診断の開発を見据え、バイオマーカーとなるDNA変異を探索している近畿大学医学部ゲノム生物学教室。その基礎研究を支えているのが次世代シーケンサIon PGM™システムです。ヒトゲノム上の複数領域をマルチプレックスでシーケンスできるIon AmpliSeq™技術を導入し、肺がんをはじめ肝がん、大腸がん、乳がんで、がん関連遺伝子の変異検出をおこなっています。Ion PGM™システムを使いこなし、1年に400～500サンプルは解析するという坂井和子氏にお話を伺いました。

有望なバイオマーカーを探す

肺がん治療薬イレッサが*EGFR*遺伝子変異をもつ症例で奏効するとの論文が2004年に報告されてから、抗がん剤に対する感受性と遺伝子変異との関係が徐々にわかってきました。*EGFR*遺伝子変異のようなバイオマーカーでがんの体外診断ができれば、一人ひとりの患者に合わせた分子標的薬を選択できます。「有望なバイオマーカーの探索には網羅的解析が有効な手段となりますが、リアルタイムPCRでは既知の変異しか確認できません。これに対してIon PGM™システムはDNA配列を直接読み取るので、多検体の新規の変異を同時に検出できるのが強みですね」と坂井氏。

10ngの微量DNAでも検出可能

解析する肺がんサンプルの多くは、がん患者のバイオプシー（生体組織診断）で得られたパラフィン包埋の組織検体です。1枚のサンプルから抽出できるDNAは30～100ngほど。「貴重なサンプルをシーケンス解析だけで使い切りたくないので、10ngから検出できるIon PGM™システムの解析能力は魅力でした」と坂井氏は語ります。Ion AmpliSeq™技術では、Cancer Hotspot パネル, Comprehensive Cancerパネル, Colon&Lung Cancerパネルという既製のキャンサーパネルに加え、カスタムパネルも積極的に利用しています。「融合遺伝子や抗がん薬耐性に関わる遺伝子をより効率的に探索できるようになりました。検出の高速化は将来的に、治療を待つ患者さんにとってメリットとなるでしょう」。

変異検出の技術を開発

ゲノム生物学教室では、変異検出の技術開発も並行して進めています。2014年4月のAACR（米国癌学会）では、参画するOncoNetworkコンソーシアムと肺がん融合遺伝子パネルの共同開発について発表。Ion AmpliSeq™ RNA ケミストリに基づく肺がん融合遺伝子パネル（Ion AmpliSeq™ RNA Lung Fusion Panel）を用いて*ALK*, *ROS1*, *RET*の融合遺伝子を検出した結果、従来のFISH法より効率的に変異が検出できることを示し、腫瘍RNAの1%以下で*EML4-ALK*融合遺伝子が検出することを報告しました。Ion PGM™システムの使い勝手については、「慣れれば楽ですね。サンプル調製を自動化するIon Chef™システムも導入したので、今後さらに時間を短縮できるでしょう」と微笑む坂井氏。バイオプシー検体の解析のみならず、採血で得られる血漿のDNAを解析するCell free DNA（cfDNA）の研究も手がけます。「私たちの基礎研究を、患者さんへの負担が少ない診断ツール開発へと橋渡ししたいのです」と話す坂井氏。最新の技術を駆使して医療への貢献を目指しています。

■ Ion AmpliSeq™ Community パネル

**さまざまなアンプリコンシーケンスのニーズに合わせて、
最先端の研究者が検証済のパネルデザインを公開しており、
すぐに利用できます。**

- 最先端の研究者による検証済パネルが利用可能
- 1プールあたり10ngのDNAからスタート
- FFPEサンプル対応
- 1サンプルあたり平均500カバレッジのデータ取得
- 変異解析、CNV解析のためのクラウド解析環境

Ion AmpliSeq™ パネルラインアップ

がん	遺伝性疾患	個人識別
● BRCA1/2 ● Colon & Lung ● TP53	● CFTR ● Dimentia	● Human Identity

▶アンプリコンシーケンスのステップ

ご利用はこちらから → www.ampliseq.com

いつ行く？ どうする？ 海外留学

Title **今こそ海外にトライ。これだ！というテーマを基点に、世界を広げる**

Number **07**

Name **杉本亜砂子 氏**（東北大学大学院 生命科学研究科生命機能科学専攻 発生ダイナミクス分野 教授）

線虫*C.elegans*の胚発生をモデル系に、細胞極性、紡錘体形成を解析し、細胞分裂のダイナミズムを鮮やかに描き出すライブイメージング技術も開発する杉本亜砂子氏（東北大学大学院生命科学研究科教授）。大学院では酵母を研究し、その後新しいモデル生物として注目されだした線虫に興味をもち、卒業後は線虫研究のメッカである米国ウィスコンシン大学へ留学しました。ユニークな留学体験や線虫研究の魅力について伺います。

酵母から線虫へ

栄養源が豊富な時は分裂で増え、枯渇すると減数分裂で有性生殖する酵母。このような分裂様式の切り替えは、多細胞生物では、体細胞での分裂と生殖細胞での減数分裂の違いに見られます。「酵母を研究するうちに、この分裂の切り替えが生じるしくみを、多細胞生物で研究したいと思い始めました」という杉本氏。1個の受精卵から細胞の運命が変わっていく現象を、半透明の身体で丸ごと研究できる線虫は、酵母の変異体作製や遺伝子解析の技術を生かせる実験系としても魅力的だったといいます。

「留学＝大御所ラボ」とは限らない

電子メールが一般的でない時代、杉本氏は、欧米の線虫研究者にエアメールを何通も出しました。第一希望は、優秀な線虫研究者の集まる米国ウィスコンシン大学の大御所教授。残念ながら最終選考で落ちますが、その時、隣のビルに新しく入る若手PIのジョエル･ロスマン（Joel Rothman）博士を紹介され、線虫のアポトーシスをテーマに留学を決めました。「大御所のラボで箔を付けるのが王道なのに大丈夫？ と周囲からは心配されましたが、逆に良かった。ジョエルにとって私は最初のポスドクなので、彼の知識を全て、直接教えてくれた。ラボの立ち上げを一緒にやった経験は、自分が日本で独立する時のシミュレーションにもなりました」（杉本氏）。

後列左から3人目がJoel Rothman氏、前列右から2人目が杉本氏。2011年6月、UCLAで開催された国際線虫集会（International *C. elegans* Meeting）にて。

線虫コミュニティの一員に

留学していた1990年代は、線虫のゲノム配列の決定、ライブイメージング、RNAi技術が確立された時期。「研究はエキサイティング。線虫研究者は、未発表データを積極的に共有し、みんなで技術を開発しようという勢いもありました。これは、線虫コミュニティで私が気に入っているところです」（杉本氏）。ここで培ったネットワークは、帰国後に始めた線虫全遺伝子の網羅的機能解析（RNAi）にも役立ったと話します。

生活してわかる文化の違い

米国の大学では、年齢、性別、国籍に関係なく、斬新なアイデアを出す若手が技術をもつ経験者にアドバイスするなど、フラットでお互いを尊重する環境がありました。「東北大学の私のラボでも、上級生だから、先生だから偉い、ということはありません」と杉本氏。「日本は研究者に“女性”とつける時点で遅れているのではないでしょうか。米国では私が女性だからと特別扱いされた意識は全くもちませんでした」とも指摘します。

好きなことを中心に世界は広がる！

若者には、「研究に対するアプローチも国や文化によって違う。頭が柔軟な若いうちに、身をもって経験してほしい」と海外留学をすすめます。大学院時代にこれだ！ と決めたテーマを続けるために、必要な技術を身につけ自ら開発してきた杉本氏。次に注目するのはゲノム編集技術だといいます。「*C.elegans*の近縁種をつかった進化的な研究もやってみたい。自分が好きで興味をもったテーマを基点に、世界は広がっていくのです」（杉本氏）。

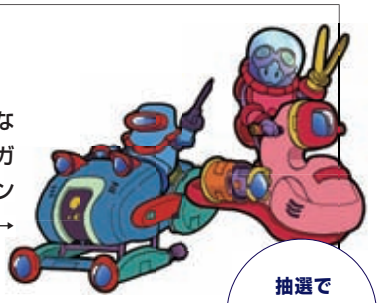
1992年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了、理学博士。1992年 -1996年米国ウィスコンシン大学マジソン校博士研究員、1996年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻助手、2001年理化学研究所 発生･再生科学総合研究センター チームリーダー、2010年4月より現職。

驚くべき科学の世紀へ

子供たちに科学の魅力を伝える活動として、6月8日(日)に日本科学未来館と共催イベントを開催します。クラブMiraikanのメンバー20人が、東京本社の実験室で研究者と同じ実験器具や試薬を使ってDNA実験に挑みます。この日は、世界中の社員がボランティア活動を行うグローバルボランティアデイ。この驚くべき科学の世紀を受け継ぐ、子供たちと実りある一日を過ごしたいと思っています。

マンガで学ぶ「ゲノム編集」

素敵なイラストのゲノム編集小冊子が完成しました。ゲノム編集の原理や必要なツールをまとめています。しかも2014年7月31日までにゲノム編集のメールマガジンに登録すると、抽選で100名様にオリジナルイラスト付きTシャツをプレゼント! ご登録やPDF閲覧、その他「ゲノム編集」技術に関する情報はこちらから →
www.lifetechnologies.com/GenomeEditors



抽選で
QUOカード
プレゼント!

NEXT 6月号はいかがでしたか?

特集の水島昇氏や留学記の杉本亜砂子氏から、若い方へのメッセージをいただきました。じっくりと研究テーマを決めるにしても、若い頃の感覚は大事なようですね。そして今号も多くのユーザーの方のお話を伺いました。再生医療や話題のゲノム編集、工学的視点からエキソソームにアプローチ中の研究者の方々。研究の幅広さと躍動感を読者の皆様にお伝えできれば幸いです。ぜひアンケートにご協力ください。抽選で10名様にQuoカード(2000円分)をプレゼントします。
バックナンバーや抜粋記事もご覧いただけます。→ URL: www.lifetechnologies.com/nextforum

photographs: muraguchi keiichiro (p.02-03)
art direction & design: masami furuta (opportune design)

公式Facebookページ&Twitterもチェック! facebook.com/LifeTechnologiesJapan @LifetechJPN

●記載価格は2014年6月現在の価格です。●消費税は含まれていません。●価格は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。●最新の価格および在庫数は、弊社ホームページ右上の"製品価格と在庫の検索"でご確認いただけます。●研究用にのみ使用できます。●診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。●記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。●販売条件はこちらをご覧ください。www.lifetechnologies.com/TC
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
Printed in Japan. LFT063-A14050B

販売店

ライフテクノロジーズジャパン株式会社
本社: 〒108-0023 東京都港区芝浦4-2-8 TEL.03(6832)9300 FAX.03(6832)9580
大阪: 〒564-0052 大阪府吹田市広芝町10-28 TEL.06(6389)1201 FAX.06(6389)1206
ウェブサイト: www.lifetechnologies.com

life technologies
A Thermo Fisher Scientific Brand